



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/85, 9/12, 1/19 // (C12N 9/12, C12R 1:865) (C12N 1/19, C12R 1:865)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/123.36</p> <p>(43) 国際公開日 1998年3月26日(26.03.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03305</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月18日(18.09.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/246749 1996年9月18日(18.09.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市観音台一丁目25番11号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 石川冬木(ISHIKAWA, Fuyuki)(JP/JP) 〒222 神奈川県横浜市港北区篠原台町3-16 白楽ハウス105号 Kanagawa, (JP) 長谷川護(HASEGAWA, Mamoru)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市観音台一丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, C CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, I JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MI MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SI TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, A BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, D ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (B BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: ARTIFICIAL CHROMOSOME</p> <p>(54) 発明の名称 人工染色体</p> <p>(57) Abstract An artificial mammalian chromosome, more specifically, a clone containing a mammalian centromere sequence and a DN replication origin and having mammalian telomere sequences added to both ends is provided by preparing a library of CEPH artificial yea chromosomes containing a human genome inserted thereinto, identifying clones holding a repetitive human alphoid sequence from th library, and further preparing a yeast strain which adds mammalian telomere sequences to the ends of the chromosome.</p>		

(57) 要約

ヒトゲノムを挿入したCEPH人工酵母染色体ライブラリーを調製し、このライブラリーの中からヒトアルフォイド繰り返し配列を保持するクローンを同定し、さらに、染色体の末端に哺乳動物型テロメア配列を付加する酵母株を作製することにより、哺乳動物型人工染色体、より詳しくは、哺乳動物型セントロメア配列及びDNA複製開始点を含み、哺乳動物型テロメア配列が両末端に付加されたクローンを提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GB	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GM	ギニア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GN	ギニアビサウ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BH	バーレーン	GR	ギリシャ	MC	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジクスタン
BJ	ブルンジ	HU	ハンガリー	MK	ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BM	バハマ	ID	インドネシア	ML	マリ	TR	トルコ
BN	ブルネイ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BO	ボリビア	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	IS	アイスランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
BS	バハマ	IT	イタリア	MX	メキシコ	US	米国
BT	ブータン	JP	日本	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
BV	ベルギー	KE	ケニア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CA	カナダ	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CC	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CD	コンゴ	KR	韓国	PL	ポーランド		
CE	セネガル	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CF	中央アフリカ共和国	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
CH	スイス			SD	スーダン		
CI	コート・ジボアール						
CM	カメルーン						
CN	中国						
CU	キューバ						
CZ	チェコ共和国						
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						
DM	ドミニカ						

## 明細書

### 人工染色体

#### 技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属する。より詳しくは、遺伝子工学技術を利用して作製した哺乳動物型人工染色体に関する。

#### 背景技術

先天的又は後天的に遺伝子に欠陥があるために発症する病気、即ち、遺伝子疾患に対しては、これまで様々な治療法が考えられてきた。その一つとして、欠陥遺伝子そのものを正常な遺伝子と入れ換えたり、正常な遺伝子を補ったりすることにより、遺伝子疾患を根本的に解決しようとするのが、遺伝子治療である。

現在、遺伝子導入の方法として臨床的、基礎的に最も研究開発が進んでいるのは、cDNAのような短いDNA断片を、本来その遺伝子の上流に存在しない異所性のエンハンサーやプロモーターの下流に直結し、ウイルスやリボソームなどを利用して、これを細胞内に導入し発現させる系である。この方法は、DNAが短いために操作が容易であり、細胞への遺伝子の導入効率が比較的高いという利点を有するが、いくつかの短所も存在する。第一に、これら方法では、導入された遺伝子の発現制御が困難な点である。即ち、用いられているプロモーターやエンハンサーがウイルスなどに由来するため、ヒト生体内での目的遺伝子の発現調節が困難な点である。第二に、導入された遺伝子の細胞内での存在様式が安定しない点である。即ち、細胞内に導入された遺伝子が、染色体DNAにランダムに組み込まれたり、染色体外に独立に存在し、細胞が行うS期におけるDNA合成やM期における染色体分配の制御を受けずに維持されたりするため、標的以外の遺伝子が破壊されたり、逆に導入遺伝子が過剰に存在したりすることである。この事実が、遺伝子

治療における治療用遺伝子の発現制御や治療効果の継続性を困難にしている。

例えば、1980年代初頭に遺伝子治療の対象として最も注目されていた鎌状赤血球貧血 (sickle cell anemia) やサラセミア (thalassemia) は、導入される治療遺伝子 (グロビン遺伝子) の厳密な発現制御が要求されるが故に、患者数が多いにもかかわらず現在では遺伝子治療の対象として注目されていない。また、グロビン遺伝子のように巨大なDNAは制限酵素による加工に限界があるため、大腸菌プラスミドの組換えよりも酵母を用いた相同組換えが有効で、酵母細胞中で直接安定した染色体が作成できる。なおかつ、ヒト細胞中で複製機能をもつならば、最も理想的な遺伝子治療が可能となる。このような遺伝子治療の分野においては、ヒト遺伝子とその発現制御領域を含めて利用でき、かつヒト細胞内で安定的に維持されるベクター系の開発が必須である。

一方、酵母においては、プロモーターやエンハンサー領域を結合した遺伝子など長鎖のDNAを利用でき、酵母のDNA複製、分配機構に従い、安定に維持される「人工染色体」、すなわちYACベクター (yeast artificial chromosome vector) が開発されている。YACベクターは、あるDNA断片が染色体として機能するためには、セントロメア、DNA複製開始点、テロメアの3つの機能的構造体が必要であるという知見を基に、この3つの機能的構造体の遺伝子を含むベクターとして開発されたものである。

しかし、ヒトも含む哺乳動物においては、酵母の上記機能的構造体は機能しないことが明らかとなっており、このため哺乳動物細胞内で機能する人工染色体を構築するためには、哺乳動物の機能的構造体または哺乳動物型に改変した機能的構造体を用いなければならない。

しかしながら、酵母のセントロメア、DNA複製開始点、テロメアは、機能が詳細に解析された数kbのDNA配列であるのに対し、哺乳動物、特にヒトのセントロメアはアルフォイド配列と呼ばれる繰り返し配列が数百kb以上に渡って繰り返される巨大DNAとして存在する。また、哺乳動物のDNA複製開始点に関しては、いまだど

のような一次構造を持った領域であるのかすら明らかにされていない。このように哺乳動物の機能的構造体の解析は酵母に比して遅れており、哺乳動物の人工染色体の構築に関しては、これまで全く開発は進められていなかった。

なお、ヒトも含む哺乳動物間では、テロメア配列の繰り返し単位となる配列が「5'-TTAGGG-3'」で共通であることが知られている。

### 発明の開示

本発明は、哺乳動物型人工染色体を提供することを課題とする。より詳しくは、本発明は、哺乳動物型テロメア配列が両末端に付加された人工染色体を提供することを課題とする。また、本発明は、哺乳動物型テロメア配列を染色体の両末端に付加する酵母株を提供することを課題とする。

染色体は、その機能の遂行のために三要素と呼ばれる最小限の機能的構造体の存在が必要である。第一は、細胞分裂に伴いDNAがS期で一度だけ複製することを保証するDNA複製開始領域、第二は、複製されたDNAが細胞分裂期において正しく一つずつ娘細胞に分配することを保証するセントロメア、第三は、線状の染色体が核内に安定して存在するために末端をキャッピングするテロメアである。

哺乳動物、特にヒトのセントロメア配列は、アルフォイド繰り返し配列と呼ばれる特定のDNA配列が少なくとも数百キロ塩基対に渡ってタンデムに繰り返された巨大DNAであることが明らかになっている (M. Ikeno, H. Masumoto & T. Okazaki, Hum Mol Genet 3: 1245-1257(1994))。このような巨大DNAは、従来の遺伝子組み換え技術では操作することはできない。そこで、本発明者等は、長鎖DNAを挿入可能な酵母のYACベクターにヒトゲノムを挿入したCEPH人工酵母染色体ライブラリーを基に、このライブラリーの中からアルフォイド繰り返し配列を保持するクローンを同定し、これを哺乳動物人工染色体の基本とした。なお、ヒトゲノムのDNA複製開始点は、その一次構造は明らかにされていないが、ヒトのゲノムDNA100kbに平均して1個存在すると考えられているため (細胞の分子生物学、第3版、教

育社)、上記のアルフォイド繰り返し配列を含むYACクローンには、DNA複製開始点も含まれていると考えられる。

しかし、このYACクローンは、テロメア配列を欠いているため、このままでは哺乳動物型染色体として機能しない。そこで、本発明者等は、得られたYACクローンのDNA末端に哺乳動物型テロメア配列を付加する方法について鋭意研究を行った。

特に、本発明者等は、構築する人工染色体が長鎖DNAであり、物理力や非特異的な酵素により容易に破壊、分解され易いことを考慮し、テロメア配列を付加する過程をインビトロではなくインビボ(酵母内)で行う方法、即ち、哺乳動物型テロメア配列を付加する酵母株の作製について鋭意研究を行った。

テロメラゼは、タンパク質成分とテロメア配列の伸長の鋳型となるRNAとから構成されていることが知られており、この鋳型RNAの配列に相補的なDNA配列として染色体にテロメア配列が付加されることが知られている。そこで、本発明者等は、酵母テロメア配列(TG<sub>1-3</sub>)<sub>n</sub>をコードする鋳型RNAをインビトロ突然変異導入法(in vitro mutagenesis)により哺乳動物型テロメア配列(TTAGGG)<sub>n</sub>をコードするように改変して発現プラスミドにクローニング後、これを酵母内に導入し、哺乳動物型テロメア配列を合成するハイブリッドテロメラゼ(プラスミド由来の哺乳動物型のRNA鋳型と宿主である酵母由来のタンパク質から構成されるテロメラゼ)を酵母内で構成させ、酵母染色体テロメア配列を哺乳動物型に置き換える株を作製した。そして、この株では、実際に酵母染色体に哺乳動物型テロメア配列が付加されていることを見出した。

すなわち本発明は、

- (1) 末端に哺乳動物型テロメア配列が付加された人工染色体、
- (2) アルフォイド配列を含む(1)記載の人工染色体、
- (3) 哺乳動物以外の生物由来のDNA複製開始点及びセントロメアを含む、(1)または(2)記載の人工染色体、
- (4) 哺乳動物以外の生物が酵母である、(3)記載の人工染色体、

(5) 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列を含む鋳型RNAと哺乳動物以外の生物由来のテロメラーゼタンパク質からなる、染色体末端に哺乳動物型テロメアを配列付加する作用を有するハイブリッドテロメラーゼ、

(6) 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列が「5'-CCC UAA-3'」を含む配列である、(5)記載のハイブリッドテロメラーゼ、

(7) 哺乳動物以外の生物が酵母である、(5)または(6)記載のハイブリッドテロメラーゼ、

(8) 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列を含む鋳型RNAを哺乳動物以外の宿主内で産生させ、該宿主の内在性のテロメラーゼタンパク質と宿主内で会合させることを特徴とする、ハイブリッドテロメラーゼの製造方法、

(9) 宿主が酵母である、(8)記載の製造方法、

(10) (5)～(7)のいずれかに記載のハイブリッドテロメラーゼを染色体に作用させることを特徴とする、末端に哺乳動物型テロメア配列が付加された人工染色体の製造方法、

(11) 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列を含む鋳型RNAを発現し、細胞内の染色体の末端に哺乳動物型テロメア配列を付加する作用を有する真核細胞、

(12) 細胞が酵母である、(11)記載の真核細胞、

(13) (11)または(12)記載の細胞に染色体を導入することを特徴とする、末端に哺乳動物型テロメア配列が付加された人工染色体の製造方法に関する。

なお、本発明において染色体とは、宿主内で宿主のゲノムとは独立して、安定にシングルコピー (single copy) として存在し、宿主の細胞周期に従って複製、染色体分配を行う能力を有するDNAを指し、通常、DNA複製開始点、セントロメア及びテロメアを含み、天然か人工かを問わない。

また、本発明における人工染色体とは、少なくとも一部に天然由来でない部分

を含む染色体を指す。

さらに、本発明における哺乳動物型テロメア配列とは、主として「5'-TTAGGG-3'」の繰り返しからなる配列を指す。

本発明の人工染色体の構築方法としては、特に制限はないが、例えば、哺乳動物細胞内で機能しうる人工染色体を構築するためには、哺乳動物のセントロメア配列及びDNA複製開始点を含むDNAをベクターに挿入し、該ベクターの末端に哺乳動物型テロメア配列を付加する方法などが考えられる。

ここで用いられるベクターとしては、長鎖DNAを挿入可能であれば特に制限はないが、例えば、酵母におけるYACベクターが挙げられる。

また、哺乳動物型テロメア配列を付加する方法としては、特に制限はないが、DNAの物理的損傷が少ない点及び細胞内での相同的組み換え法を利用した遺伝子操作が可能である点で、インビボで哺乳動物型テロメラーゼを発現させて作用させる方法が好ましい。なお、哺乳動物型テロメラーゼには、テロメラーゼの構成要素のうちRNA鋳型のみが哺乳動物型に改変されているハイブリッドテロメラーゼも含まれる。テロメラーゼの哺乳動物型への改変は、例えば、酵母テロメラーゼのRNA鋳型をコードする遺伝子TLC1 (Singer, M.S., and Gottschling, D.E., Science, 266: 404-409, 1994) の鋳型部分に相当するDNA配列、「CACCACACCCACACAC」をインビトロ突然変異導入法 (in vitro mutagenesis) により哺乳類型の「CACC TAACCCTAACCC」に改変した変異TLC1遺伝子を酵母内で強制発現させ、酵母のもつテロメラーゼ蛋白質とインビボ (in vivo) で会合させて機能的なハイブリッドテロメラーゼを再構成する、などの方法によって行うことが可能である。

上記の過程により構築された人工染色体は、細胞内で機能させたい所望の遺伝子を組み込んで、標的細胞に導入することが可能である。この遺伝子の種類には、特に制限はない。本発明の人工染色体には、導入可能なDNAの長さに理論上の限界がないため、cDNAに限られず、上流のプロモーターやエンハンサーなどcisに存在する発現調節領域を含んだ遺伝子を用いたり、複数の遺伝子を同時に用いたり



することも可能である。このことから例えば、サラセミア症におけるヘモグロビン遺伝子など、厳密な発現の調節が必要と考えられる遺伝子治療において、発現調節に必要なcis領域を含む長大なDNAを人工染色体として遺伝子導入することや、染色体異常症などで長大なDNA領域が欠損している病態に対して、該DNA領域を全体として遺伝子導入することなどの応用が考えられる。

本発明の人工染色体を細胞に導入する方法としては、動物細胞への微小注入法やリポフェクション法など方法が挙げられるが、特に、人工染色体の物理力による破壊が少ない点で、細胞融合法が好ましい。

人工染色体を導入される細胞としては、人工染色体がその内部で機能可能であればであれば、特に制限はない。例えば、人工染色体が哺乳動物型テロメア配列を末端に有し、哺乳動物アルフォイド配列を含む場合には、ヒト細胞の他、霊長類の動物細胞が可能であり、マウスなどの齧歯類も可能性がある。

#### 発明を実施するための最良の形態

〔実施例1〕 ヒトセントロメア配列およびヒトDNA複製開始点を含むYACクローンの調製

文献 (Hum Mol Genet 3:1245-1257(1994)) 記載の方法で、長鎖DNAを挿入可能な酵母のYACベクターにヒトゲノムを挿入したCEPH人工酵母染色体ライブラリーからヒトアルフォイド配列を有するクローンの選抜を行った。

この結果、CEPH YACライブラリーのうち、749H1、818H1、858F11、882C10、および831B6の5つのクローンがヒト21番染色体アルフォイド配列を有していた。このうち全長約800kb、アルフォイド配列が約55kb（この中にはヒトDNA複製開始点が含まれていると考えられる）含まれる858F11クローンを以下の実験に用いた。

なお、CEPH YACライブラリーで用いられているpYAC4ベクターには、哺乳類細胞における選択マーカーが存在しないので、858F11クローンを持つ酵母にpYACNeoNot (Howard Cooke, Medical Research Council(MRC) Human Genetics Unit, Edinb

urgh, UKより供与) のSall/ClaI断片をトランスフォームし、酵母内における相同的遺伝子組み換えにより858F11クローンにネオマイシン耐性遺伝子 $neo^r$ とSUP4遺伝子を導入した。この際、YACクローン内にアルフォイド配列が維持されていることはサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

#### [実施例2] 哺乳動物型テロメア配列を付加する酵母株の作製

##### (1) 酵母テロメレーズの鋳型RNAのヒト型への改変

出芽酵母 (*S.cerevisiae*) においては、テロメレーズの鋳型RNAをコードしている遺伝子TLC1が既に報告されている。そこでまず、インビトロ突然変異導入法 (*in vitro* mutagenesis) によりTLC遺伝子の鋳型部分に変異を導入し、酵母テロメア配列(TG<sub>1-3</sub>)<sub>n</sub>をヒト型テロメア配列(TTAGGG)<sub>n</sub>をコードするように改変した変異TLC1対立遺伝子(以下「HTM3」と称する)を作製した。即ち、酵母テロメラーゼのRNA鋳型をコードする遺伝子TLC1の鋳型部分に相当するDNA配列、「CACCACACCCACACAC」をヒト型の「CACCTAACCCCTAACCC」に改変した。更に、TagプライマーによりHTM3遺伝子の両端にPvuII/XhoI切断部位を導入した。

##### (2) GALプロモーターによるHTM3の過剰発現

HTM3のPvuII/XhoI断片を、pYES2ベクターのPvuII/XhoI部位に挿入した(以下、「YEpUGH3」と称する)。pYES2ベクターは、URA3遺伝子、2 $\mu$ mプラスミド複製開始点、及びGAL1プロモーターを持つ発現ベクターである。酵母をYEpUGH3で形質転換し、HTM3をGAL1プロモーターにより過剰発現させることで、インビボでヒトテロメア配列を合成する機能改変テロメレーズを保持する酵母変異株(以下「YHTM:Yeast Human Telomere Maker」と称する)を得た。

YHTM内で、機能改変テロメレーズが実際に機能しているか、即ち、酵母染色体の末端にヒト型テロメア配列が付加されているかをサザンハイブリダイゼーションにより検討した。サザンハイブリダイゼーションは、ヒト型テロメア配列に対応するオリゴDNA「(CCCTAA)<sub>4</sub>」をプローブとして、5xSSPE、0.5%SDS、0.5xDenhardt、及び20 $\mu$ g/mlのh.s.DNAからなるハイブリダイゼーション溶液中で、42°Cに

て行った。反応後、室温で10分間の1xSSPE及び0.1%SDSからなる溶液による洗浄を2回行い、さらに室温で10分間、0.1xSSPE、0.1%SDSからなる溶液で洗浄した。洗浄後、FUJIイメージアナライザープレートに20時間感光して、検出した。この結果、目的の位置にバンドが検出され、酵母染色体にヒト型テロメア配列が付加されていることが確認された。

さらに、酵母染色体末端のクローニング及びその塩基配列の決定を行った。

酵母ゲノムDNAを抽出し、T4ポリメラーゼにより平滑化した後、制限酵素XhoIにより切断した。アガロースゲル電気泳動後、ゲルから0.9～1.1kbpの断片を回収し、pBluescriptIISK（東洋紡）のEcoRV/XhoI断片約2.9kbpとライゲーションし、大腸菌に形質転換した。酵母サブテロメア領域に存在する繰り返し配列をプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンを単離し、常法により塩基配列の決定を行った。この結果、約140bpの酵母テロメア領域がクローニングされ、その中にヒトテロメア配列の「CCCTAA」が2～5回の繰り返りで、タンデムに存在していた。

### (3) TLC1遺伝子をHTM3で置換した酵母株の作製

酵母染色体上のTLC1遺伝子を、酵母内の相同組み換えを用いてHTM3と完全に置換し、ヒトテロメア配列を合成する機能改変テロメレース遺伝子をゲノム内に有する酵母変異株（YNH3）を得た。YNH3の染色体末端について上記と同様の方法でクローニング及び塩基配列の決定を行った。この結果、約190bpの酵母テロメア領域がクローニングされ、その中にヒトテロメア配列の「CCCTAA」が最高18回の繰り返し（109bp）で、末端方向にタンデムに存在していた。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、哺乳動物型アルフォイド配列を有するクローンが提供された。また、本発明により染色体の末端に哺乳動物型テロメア配列を付加する酵母株が提供された。本発明の人工染色体は、導入可能なDNAの長さに理論上の限界がなく

、また宿主内で宿主のゲノムとは独立して、安定にシングルコピー (single copy) として存在し、宿主の細胞周期に従ってDNA複製、染色体分配が行われる。従って、本発明の人工染色体には、例えば、ヒト治療用遺伝子をその発現調節領域も含めた形で導入することができ、生理的な条件下で導入遺伝子の発現の調節を行わせることが可能である。

## 請求の範囲

1. 末端に哺乳動物型テロメア配列が付加された人工染色体。
2. アルフォイド配列を含む、請求項 1 記載の人工染色体。
3. 哺乳動物以外の生物由来の DNA 複製開始点及びセントロメアを含む、請求項 1 または 2 記載の人工染色体。
4. 哺乳動物以外の生物が酵母である、請求項 3 記載の人工染色体。
5. 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列を含む鋳型 RNA と哺乳動物以外の生物由来のテロメラーゼタンパク質からなる、染色体末端に哺乳動物型テロメアを配列付加する作用を有するハイブリッドテロメラーゼ。
6. 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列が「5'-CCC UAA-3'」を含む配列である、請求項 5 記載のハイブリッドテロメラーゼ。
7. 哺乳動物以外の生物が酵母である、請求項 5 または請求項 6 記載のハイブリッドテロメラーゼ。
8. 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列を含む鋳型 RNA を哺乳動物以外の宿主内で産生させ、該宿主の内在性のテロメラーゼタンパク質と宿主内で会合させることを特徴とする、ハイブリッドテロメラーゼの製造方法。
9. 宿主が酵母である、請求項 8 記載の製造方法。
10. 請求項 5～7 のいずれかに記載のハイブリッドテロメラーゼを染色体に作用させることを特徴とする、末端に哺乳動物型テロメア配列が付加された人工染色体の製造方法。
11. 哺乳動物型テロメア配列に相補的な配列を含む鋳型 RNA を発現し、細胞内の染色体の末端に哺乳動物型テロメア配列を付加する作用を有する真核細胞。
12. 細胞が酵母である、請求項 11 記載の真核細胞。
13. 請求項 11 または 12 記載の細胞に染色体を導入することを特徴とする、末端に哺乳動物型テロメア配列が付加された人工染色体の製造方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03305

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/85, C12N9/12, C12N1/19 // (C12N9/12, C12R1:865)  
(C12N1/19, C12R1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/85, C12N9/12, C12N1/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Hum. Mol. Genet. 3(8) (1994) S.S. Taylor "Addition of functional human telomeres to YACs" p. 1383-1386	$\frac{1}{5} - \frac{4}{10}$ 11 - 13
Y A	Genes & Development 8(5) (1994) C. Autexier "Functional reconstitution of wild-type and mutant Tetrahymean telomerase" p. 563-575	$\frac{5}{1-4, 11-13}$
Y A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) R.K. Moyzis "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) <sub>n</sub> , present at the telomeres of human chromosomes" p. 6622-6626	$\frac{6, 7}{1-5, 8-13}$

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 11, 1997 (11. 12. 97)

Date of mailing of the international search report

December 24, 1997 (24. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/85, C12N9/12, C12N1/19 // (C12N9/12, C12R1:865) (C12N1/19, C12R1:865)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/85, C12N9/12, C12N1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	Hum. Mol. Genet. 3 [8] (1994) S. S. Taylor 「Addition of functional human telomeres to YACs」 p. 1383-1386	<u>1-4</u> <u>5-10</u> 11-13
<u>Y</u> A	Genes & Development 8 [5] (1994) C. Autexier 「Functional reconstitution of wild-type and mutant Tetrahymena telomerase」 p. 563-575	<u>5-10</u> 1-4, 11-13
<u>Y</u> A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) R. K. Moyzis 「A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) <sub>n</sub> , present at the telomeres of human chromosomes」 p. 6622-6626	<u>6, 7</u> 1-5, 8-13

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたものの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 97

国際調査報告の発送日

24. 12. 97

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
 田中 美奈子

4B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**